Immucor Transplant Diagnostics, Inc.
550 West Avenue, Stamford, Connecticut 06902; USA
Tel.: +1 203 328 9500 oder (888)-329-0255 (gebührenfrei in den USA und Kanada);
Fax: +1 203 328 9599
WWW.IMMUCOR.COM

Produktdokumentation und Übersetzungen erhältlich unter: *www.Immucor.com*

P R O D U K T B E I L A G E

LIFECODES HLA-SSO TYPISIERUNGSSETS zur Verwendung mit Luminex®

Für in-vitro-Diagnose.

INHALTSVERZEICHNIS

Definition der Symbole 1
Reagenzien nach Katalognummer 2
Zweckbestimmung 2
Zusammenfassung und Erläuterung 2
Verfahrensprinzipien 2
Reagenzien 3
A. Identifizierung 3
B. Sicherheits- und Warnhinweise 2
C. Anweisungen für die Aufbewahrung 2
D. Reinigung bzw. Vorbereitung für den Gebrauch 2
E. Instabilitätshinweise 2
Erforderliche Geräte 2
Gewinnung und Aufbereitung der Proben 3
Verfahren 3
A. Mitgelieferte Materialien 3
B. Benötigte, aber nicht mitgelieferte Materialien, Reagenzien und Ausrüstung 3
Gebrauchsanweisung 3
A. Reinigung der genomischen DNA 4
B. Amplifizierung 4
C. Hybridisierung 4
D. Analyse mit Luminex Instrumentarium 5
Ergebnisse 5
Qualitätskontrolle 6
Grenzen des Verfahrens 6
Fehlerbeseitigung 6
Erwartete Werte 6
Besondere Leistungsmerkmale 7
Literatur 7
Eingeschränkte Lizenz 7
Verwendete Warenzeichen 7
Anhang A 7
Gel-Elektrophorese 7
Gel-Interpretation 7

DEFINITION DER SYMBOLE (Produktetiketten und zusätzliche Dokumente)

Chargen-bezeichnung	LOT	Bestell-nummer	REF	Zulässiger Temperatur-bereich		Temperatur-obergrenze	
Verwendbar bis		Vor Licht schützen		Ausreichend für N Ansätze		Nicht einfrieren	
Achtung – Gebrauchs-anweisung beachten		Gebrauchs-anweisung beachten		Hersteller		Bevollmächtig-ter für Europa	EC REP

REAGENZIEN NACH KATALOGNUMMER

LC-CE **LIFECODES HLA-C eRES Typisierungsset** zur Verwendung mit Luminex® Produkt-Nr. 628850-50

Reagenz		Produktnummer	Füllmenge	Lagerung	Σ 50
MX-C	LIFECODES HLA-C Mastermix	628803	870 µl	2 bis 8 ºC	Ausreichend für 50 Proben
BM-CeRES	LIFECODES HLA-C eRES Sondenmischung ‡	628804	810 µl	2 bis 8 ºC **Vor Licht schützen**	CE
DS	Verdünnungslösung	628515	19,7 ml	18 bis 30 ºC	

LM-DPB **LIFECODES HLA-DPB Typisierungsset** zur Verwendung mit Luminex® Produkt-Nr. 628910

Reagenz		Produktnummer	Füllmenge	Lagerung	Σ 20
MX-DPB	LIFECODES HLA-DPB Mastermix	628903	420 µl	2-8 ºC	**Ausreichend für 20 Proben**
BM-DPB	LIFECODES HLA-DPB Sondenmischung ‡	628902	360 µl	2-8 ºC **Vor Licht schützen**	CE
DS	Verdünnungslösung	628155	9,9 ml	18-30 ºC	

LM-DQA **LIFECODES HLA-DQA Typisierungsset** zur Verwendung mit Luminex® Produkt-Nr. 628061

Reagenz		Produktnummer	Füllmenge	Lagerung	Σ 20
MX-DQA	LIFECODES HLA-DQA Mastermix	628062	420 µl	2-8 ºC	**Ausreichend für 20 Proben**
BM-DQA	LIFECODES HLA-DQA Sondenmischung ‡	628063	360 µl	2-8 ºC **Vor Licht schützen**	CE
DS	Verdünnungslösung	628155	9,9 ml	18-30 ºC	

‡Sondenmischungen sind lichtempfindlich: Lichteinwirkung auf ein Minimum beschränken, **VORSICHT**: Komponenten nach Ablauf des Verbrauchsdatums nicht mehr verwenden.

ZWECKBESTIMMUNG

DNA-Typisierung von Klasse-I- und Klasse-II-HLA-Allelen.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG

DNA-basierte HLA-Typisierung unter Verwendung von PCR-amplifizierter DNA ist ein verbreitetes Laborverfahren. PCR-Amplifikation von DNA wird als Mittel zur Anreicherung einer ausgewählten DNA-Region eingesetzt. Für HLA-Typisierung wird ein anschließendes Nachweisverfahren angewendet, um die Eigenschaften der amplifizierten DNA zu bestimmen. Verschiedene Typen von Nachweisverfahren, wie etwa SSP (1), direkte SSOP (2), RFLP (3) und reverses SSOP-Dot-Blotting (4), wurden bei der HLA-Typisierung verwendet. Ebenso wie SSOP- und reverse Dot-Blotting-Methoden verwenden LIFECODES HLA-SSO-Typisierungssets sequenzspezifische Oligonukleotide (SSOs) zum Nachweis, welche HLA-Allele in einer PCR-amplifizierten Probe vorliegen. Bei der Bestimmung der Fähigkeit, die verschiedenen bei der PCR-Amplifikation vorliegenden Allele voneinander zu unterscheiden, kommt es auf das Set der eingesetzten SSOs, nicht auf die Methodik an. Während reverse Dot-blotting- und SSOP-Methoden mit Enzymmarkierungen und kolorimetrischen Substraten arbeiten, bei denen eine anschließende Entwicklung erforderlich ist, handelt es sich bei dem LIFECODES-Nachweisverfahren um ein homogenes Mehrfachsystem. Das bedeutet, alle SSOs werden gleichzeitig analysiert, und der gesamte Nachweis wird in einem einzigen Reaktionsgefäß unter Zusatz eines einzigen Reagenzes durchgeführt.

VERFAHRENSPRINZIPIEN

Das LIFECODES HLA-SSO-Typisierungsverfahren basiert auf der Hybridisierung von markierten einsträngigen PCR-Produkt-zu-SSO-Sonden. Bei der Amplifikation von DNA unter Verwendung von PCR werden normalerweise äquimolare Mengen von Vorwärts- und Rückwärtsprimern verwendet, um ein doppelsträngiges DNA-Produkt zu erzeugen. Wenn die Menge des einen Primer im Vergleich zum anderen größer ist, erzeugt die Reaktion zusätzlich zu dem doppelsträngigen Produkt ein einsträngiges DNA-Produkt. Während der ersten Zyklen der LIFECODES-Amplifikationsstufe wird doppelsträngige DNA erzeugt. Sobald der begrenzende Primer erschöpft ist, verwendet der verbleibende Primer das doppelsträngige Produkt als Matrize für die Generierung von einsträngiger DNA. Diese Methode erzeugt sowohl doppelsträngige als auch einsträngige Produkte, die nach ihrer Denaturierung beide an der Hybridisierungsreaktion beteiligt sind.

Jede der verschiedenen Sonden kann einer Sequenz innerhalb der amplifizierten DNA homolog sein, die nur mit einem bestimmten Allel bzw. einer bestimmten Allelgruppe vorkommt. Diese Sonden sind also so gestaltet, dass jede Sonde vorzugsweise mit einer komplementären Region hybridisiert, die in der amplifizierten DNA vorliegen kann oder auch nicht. Zusätzlich wird die amplifizierte DNA auch mit einer oder mehreren konsensuellen Sonden hybridisiert, die zu in allen Allelen eines Locus vorliegenden Sequenzen homolog sind. SSO-Typisierung kann durch die Art des biologischen Materials, die Reinigungsmethode sowie durch die Menge und Integrität der genomischen DNA beeinflusst werden. Daher kann das für die konsensuelle(n) Sonde(n) erhaltene Signal als Indikator für den Erfolg der Amplifikations- und Hybridisierungsverfahren dienen. Das bei der konsensuellen Sonde erhaltene Signal kann außerdem verwendet werden, um das Signal der allelspezifischen Sonden zu normalisieren und korrigierend bei Variationen der Menge amplifizierten Produkts bei der Hybridisierungsreaktion zu wirken. Die Analyse der durch die SSO-Typisierung erzielten Ergebnisse kann verwendet werden, um Vorliegen oder Fehlen von bestimmten DNA-Sequenzen in amplifizierter DNA festzustellen und um die eventuell in der Probe befindlichen Allele zu identifizieren.

Für das LIFECODES HLA-SSO-Typisierungsverfahren werden die Sonden mit Luminex-Mikrosphären verbunden, die zur Anwendung mit dem Luminex Instrumentarium vorgesehen sind. Bis zu 100 unterschiedliche Populationen Luminex-Mikrosphären können mit Hilfe des Luminex Instrumentariums miteinander vermischt und analysiert werden, da jede Mikrosphärenpopulation durch ihre charakteristische Fluoreszenzsignatur bzw. -farbe unterschieden werden kann. Mit jeder Farbmikrosphäre kann eine unterschiedliche SSO-Sonde verbunden werden. Bei einer Mischung verschiedener Sonden können diese durch ihre Verknüpfung mit bestimmten Farbmikrosphären voneinander unterschieden werden. Mit dem Luminex Instrumentarium ist es ebenfalls möglich, die relativen Mengen markierter, zu jeder Luminex Mikrosphäre hybridisierter PCR-Produkte zu quantifizieren. Daher kann das mit den SSO-Sonden in dem LIFECODES-

Nachweisverfahren erhaltene relative Signal, wie im Falle anderer SSOP-Methoden, eingesetzt werden, um den Sonden die Eigenschaft positiver oder negativer Reaktivität mit der amplifizierten DNA-Probe zuzuordnen (siehe Kapitel „Ergebnisse“). Dies liefert wiederum die für die Bestimmung des HLA-Phänotyps der Probe erforderlichen Informationen.

REAGENZIEN

A. Identifizierung

Siehe Tabellen im Abschnitt „Reagenzien nach Katalognummer“ mit der vollständigen Auflistung der Produkte und Katalognummern.

B. Sicherheits- und Warnhinweise

1. Für in-vitro-Diagnose.
2. Besondere Pipetten sollten für die Prä-PCR-Verfahren sowie für die Post-PCR-Verfahren vorgesehen werden.
3. Biogefahr: Sämtliche Proben biologischen Materials sowie Blutproben sollten als potentiell infektiös behandelt werden. **Wenden Sie allgemeine Vorsichtsmaßnahmen bei der Handhabung an.**
4. Verdünnungslösung, Sondenmischungen, Taq-Polymerase und Phycoerythrin-konjugiertes (PE)-Streptavidin enthalten gefährliche Verbindungen. Vermeiden Sie Kontakt mit Haut und Augen und Sämtliche Materialien nach Gebrauch gemäß den lokal geltenden Vorschriften entsorgen. Siehe zusätzliche Informationen im Sicherheitsdatenblatt.
5. Ergebnisse dieser Sets dürfen nicht als alleinige Grundlage für medizinische Entscheidungen bezüglich des Patienten herangezogen werden.

C. Anweisungen für die Aufbewahrung

1. Die jeweils geeignete Lagertemperatur ist auf dem Packungsetikett der Setkomponente verzeichnet.
2. Sondenmischungen und Phycoerythrin-konjugiertes (PE)-Streptavidin sind lichtempfindlich. **VOR LICHT SCHÜTZEN. NICHT EINFRIEREN**.
3. Komponenten nach Ablauf des Verbrauchsdatums nicht mehr verwenden.

D. Reinigung bzw. Vorbereitung für den Gebrauch

Siehe „Gewinnung und Aufbereitung der Proben“.

E. Instabilitätshinweise

1. Falls Salze während Versand oder Lagerung aus der Lösung präzipitiert haben sollten, müssen sie vor Gebrauch durch Vortexen bei Zimmertemperatur (18 bis 30 ºC) wieder vollständig aufgelöst werden.
2. Verwenden Sie kein R-Phycoerythrin-konjugiertes Streptavidin, das während des Transports oder während der Lagerung gefroren war.

ERFORDERLICHE GERÄTE

1. Luminex Instrumentarium und XY PLATFORM (Produkt Nummer 888300, 888310)
2. Thermalcycler mit heizbarem Deckel, anpassbaren Anlaufzeiten, einem Mindesttemperaturbereich von 2 °C bis 100 °C und einer Genauigkeit von mind. +/- 0,5 °C. Die Bedingungen für Thermalcycler müssen zur Optimierung ihrer Profile möglicherweise angepasst werden. Thermalprofile sind über den technischen Service erhältlich: Tel. (203) 328-9500 oder (888) 329-0255.

GEWINNUNG UND AUFBEREITUNG DER PROBEN

a. Menschliche DNA kann mit einer validierten Methode, die die nachfolgenden Kriterien erfüllt, aus Vollblut, Buffy-Coats und Wangenabstrichen gewonnen werden.
b. DNA, die aus in EDTA und ACD (Acid-Citrate-Dextrose) konserviertem Blut gewonnen wurde, wurde getestet und erbringt nachweislich die in diesem Test erwartete Leistung. DNA aus mit Heparin konserviertem Blut kann in diesem Test nicht verwendet werden. Andere Konservierungsmittel wurden nicht getestet.
c. Die isolierte DNA sollte sich in 10 mM TRIS, pH 8,0 – 9,0, bzw. in nucleasefreiem Wasser befinden. Bei Vorliegen eines Chelatbildners wie etwa EDTA sollte die finale Konzentration des Chelatbildners nicht über 0,5 mM liegen.
d. Der Kontakt mit Alkohol, Detergenzien bzw. Salzen kann die DNA-Amplifizierung nachteilig beeinflussen.
e. Die finale DNA-Konzentration sollte bei 10 – 200 ng/µl liegen.
f. Absorbanzmessungen der DNA-Probe bei 260 und 280 nm sollten ein Verhältnis von 1,65 bis 2,0 ergeben.
g. Die DNA kann nach der Isolation unverzüglich verwendet bzw. bei –20 ºC bis zu 1 Jahr lang gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren/Auftauen sollte vermieden werden, da dies zu DNA-Abbau führen kann.

VERFAHREN

A. Mitgelieferte Materialien (Siehe Tabellen im Abschnitt „Reagenzien nach Katalognummer“ mit entsprechenden Informationen)

- Geeignete Mastermix (MX)
- Geeignete Sondenmischung/-mischungen (BM)
- Verdünnungslösung (DS)
- Schwellenwerttabelle(n), Sondentrefferdiagramm(e)

B. *Benötigte*, aber nicht mitgelieferte Materialien, Reagenzien und Ausrüstung (wie aufgelistet oder gleichwertig)

- Phycoerythrin-konjugiertes (PE)-Streptavidin (SA-PE) 1mg/ml (Lifecodes Kat.-Nr. 628511)
- Luminex-Hüllstromflüssigkeit (1x oder 20x Lifecodes Kat.-Nr. 628005 oder 628025)
- Rekombinante Taq-Polymerase
- Vortexmixer
- Nucleasefreies Wasser (Lifecodes Kat.-Nr. 757003; 20 ml)
- PCR-Gefäße und -Kappen (AB Gene® 0,2 ml Thermostreifen, Nr. AB0451/G)
- Thermalcycler-(PCR)-96-Kavitätenplatten (Costar® Nr. 6509)
- Microseal™-Film (Bio-Rad. Nr. MSA-5001) bzw. Bande (Costar® Nr. 6524)
- Thermalcycler (siehe Erforderliche Geräte, Seite 3)
- Wasserbad-Sonikator (Fisher Scientific, Nr. FS15 oder FS20)
- Mikrozentrifuge
- Barrier Filterspitzen
- Luminex Kalibrierungsbeads (Cal 1, Cal 2, Con 1 und Con 2, Lifecodes Kat.-Nr. 628006, 628007, 628008 bzw. 628009)
- Pipettierhilfen, Mehrkanalpipettierhilfen und Wattestäbchen, (1 – 20 µl, 20 – 200 µl, 1000 µl)
- Tabellenkalkulationssoftware zum Betrachten von kommagetrennten (csv) Dateien
- Hitzeblock (Fisher Scientific Standard-Hitzeblock, Nr. 13259-030)
- 70 % Isopropanol oder 20 % Bleichmittel

GEBRAUCHSANWEISUNG

ANMERKUNGEN:

- Sondenmischungen und PE-Streptavidin sind lichtempfindlich: **Vor Licht schützen und nicht einfrieren**.
- Beads bei 55 – 60 ºC mindestens 5 – 10 Minuten anwärmen, um die Komponenten vollständig in der Sondenmischung aufzulösen.
- Kurz beschallen (~15 Sek.), dann Sondenmischung etwa 15 Sekunden vortexen, um die Beads vollständig zu suspendieren.

- Lassen Sie bei der Aliquotierung äußerste Vorsicht walten, indem Sie kalibrierte Pipetten verwenden. Bei Nichtbeachtung droht Verlust der Reagenzien und Versagen der Probe.
- Alle Temperaturvorgaben müssen genau eingehalten werden. Schon Fluktuationen in einer Größenordnung von +/- 0,5 °C können die Ergebnisse beeinträchtigen.
- Im Hybridisierungsstadium sollten die Proben nicht länger als 5 Minuten bei 56 °C in verdünntem Zustand verbleiben (siehe Abschnitt „Ergebnisse“).
- Es ist empfehlenswert, die amplifizierten Proben so bald wie möglich zu analysieren. Falls die Proben nicht *noch am selben Tag* den Luminex Instrumentarium durchlaufen können, ***kann das amplifizierte Produkt vor dem Gebrauch bis zu 3 Tage bei 2 – 8 ºC aufbewahrt werden. Eine längere Lagerung bis zur Durchführung des Nachweisverfahrens ist bei –20 ºC für einen Zeitraum von bis zu einer Woche möglich. Das amplifizierte Produkt darf nur einmal eingefroren und aufgetaut werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen führt zum Abbau der amplifizierten Proben und liefert unzureichende Ergebnisse beim Assay***.

A. Reinigung der genomischen DNA

durch Anwendung einer Methode eigener Wahl; die finale Konzentration sollte bei 10 – 200 ng/µl liegen. Falls erforderlich, mit nucleasefreiem Wasser anpassen. Sämtliche Proben in ähnlichen Konzentrationen halten.

B. DNA-Amplifizierung (PCR)

1. Den Mastermix bis auf Zimmertemperatur anwärmen (18 bis 30 ºC).
2. Die Reagenzien etwa 10 Sekunden vorsichtig vortexen. Dadurch wird sichergestellt, dass die Salze gelöst sind. Kurzzeitig (5 – 10 Sekunden) in Mikrozentrifuge drehen, um die Inhaltsstoffe bis auf den Boden des Gefäßes zu verteilen.
3. Gemäß **Tabelle 1** unten unter Verwendung der angegebenen Menge jeder einzelnen Komponente pro Reaktion (außer für DNA) die Komponenten zur Verstärkung für n+1 Reaktionen aufbereiten. Zu einem finalen Volumen von 50 µl pro Reaktion mit nucleasefreiem Wasser bringen. Vorsichtig vortexen, drehen und auf Eis legen.
4. Die geeignete Menge genomischer DNA **(100 bis 300 ng)** in die PCR-Gefäße pipettieren.
5. Den Verstärkungsmix in die PCR-Gefäße mit der genomischen DNA aliquotieren. (Das Gesamtvolumen von Mastermix und genomischer DNA sollte für jede Probenreaktion 50 µl sein.)
6. Gefäße fest mit Kappen verschließen, um Evaporation während der PCR zu verhindern.
7. Die Proben in den Thermalcycler geben und das Programm ablaufen lassen, siehe **Tabelle 2.**

Tabelle 1. Reaktionskomponenten für die Amplifikation

Komponente	Menge pro PCR-Probenreaktion
LIFECODES Mastermix	15 µl
Genomische DNA **10 – 200 ng/µl**	**Gesamtmenge von ~200 ng**
Taq-Polymerase	0,5 µl (2,5 U)
Nucleasefreies Wasser	Zu 50 µl finalem Volumen

Tabelle 2. Thermalcyclerbedingungen für die Amplifikation

5 Min lang bei 95 ºC
Anzahl Zyklen: 1
30 Sek. lang bei 95 ºC
45 Sek. lang bei 60 ºC
45 Sek. lang bei 72 ºC
Anzahl Zyklen: 8
30 Sek. lang bei 95 ºC
45 Sek. lang bei 63 ºC
45 Sek. lang bei 72 ºC
Anzahl Zyklen: 32
15 Min. lang bei 72 ºC
Anzahl Zyklen: 1

Anmerkung: Um genaue Ergebnisse bei der Probenamplifizierung sicherzustellen, sehen Sie unter „Gel-Elektrophorese“ nach (Anhang A).

C. Hybridisierung

- **Sorgen Sie dafür, dass die Hybridisierungspuffer-Komponenten der LIFECODES Sondenmischung aufgelöst und die Beads vollständig suspendiert sind.**
- **Luminex Instrumentarium und XY-Plattform einschalten, um ein 30-minütiges Anwärmen zu ermöglichen.**

1. Sondenmischung in einem 55 – 60 ºC Hitzeblock mindestens 5 – 10 Minuten anwärmen, um die Komponenten in der Sondenmischung vollständig aufzulösen.
2. Kurz beschallen (~15 Sek.), dann Sondenmischung etwa 15 Sekunden vortexen, um die Beads vollständig zu suspendieren.
3. 5 µl Locus-spezifischen PCR-Produkts in einer Thermalcycler-96-Kavitätenplatte (Costar® Nr. 6509) aliquotieren.
4. 15 µl der **geeigneten** Sondenmischung in jede Kavität aliquotieren. Beim Aliquotieren der Sondenmischung in mehr als 10 Kavitäten die Sondenmischung nach jedem Satz von 10 vorsichtig vortexen. Die Platte mit Polyethylenband versiegeln (Costar® No. 6524).
5. Proben unter folgenden Inkubationsbedingungen hybridisieren:

Tabelle 3. Thermalcyclerbedingungen für die Hybridisierung

5 Minuten lang bei 97 ºC
30 Minuten lang bei 47 ºC
10 Minuten lang bei 56 ºC
56 ºC HALTEN

6. Während die Proben hybridisieren, bereiten Sie eine 1:200 Verdünnungslösung/PE-Streptavidinmischung auf. Kombinieren Sie 170 µl Verdünnungslösung (DS) und 0,85 µl 1mg/ml PE-Streptavidin (SA-PE) pro Probe. *Es ist empfehlenswert, ausreichend Verdünnungslösungs-mischung für n+1 Proben herzustellen, um Pipettierverluste auszugleichen.* ***(Siehe Tabelle 4)***
7. *Verdünnungslösung/PE-Streptavidinmischung im Dunkeln bei Zimmertemperatur aufbewahren; PE-Streptavidin ist lichtempfindlich!* Die Verdünnungslösung kann 5 Minuten bei 45 ºC gewärmt werden und beim Eintreffen gevortext werden, um sicherzustellen, dass sämtliche Komponenten gelöst sind. Die Verdünnungslösung muss Zimmertemperatur (18 - 30 ºC) haben, bevor die Mischung hergestellt wird**. Vor Gebrauch aufbereiten und überschüssige Anteile beseitigen.**
8.

Tabelle 4. Aufbereitungsvolumen Verdünnungslösung

Proben-Nr.	Verdünnungslösung (DS)	PE-Streptavidin (SA-PE)
1	170 µl	0,85 µl
5	850 µl	4,25 µl
10	1700 µl	8,5 µl
20	3400 µl	17 µl
50	8500 µl	42,5 µl

Anmerkung: HYBRIDISIERUNGSPROGRAMM NICHT ABBRECHEN, BEVOR DAS TABLETT VOM THERMALCYCLER ENTFERNT WURDE!

8. Bei 56 ºC halten, während sich das Tablett auf dem Thermalcycler befindet. Jede Probe mit 170 µl der aufbereiteten Verdünnungslösung/PE- Streptavidinmischung verdünnen. **Alle Proben müssen innerhalb von 5 Minuten verdünnt werden (im Anschluss an den 10 Minuten dauernden Pausenschritt bei 56°C).**
9. Das Probentablett vom Thermalcycler entfernen und in das Luminex Instrumentarium stellen.

D. Analyse mit Hilfe des Luminex Instrumentariums*

Zur Erzielung der besten Ergebnisse sollten die Proben sofort mit Hilfe des Luminex Instrumentariums ausgewertet werden. Proben können bis zu 30 Minuten nach erfolgter Verdünnung abgelesen werden. Falls nicht sofort abgelesen wird, Proben vor Licht schützen.

1. Das Luminex Instrumentarium zwischen 30 Minuten und 4 Stunden vor Auswertung der Proben einschalten.
2. Vor der Analyse der Proben auf dem Luminex Instrumentarium einen Chargendurchgang durchführen, bei dem die Proben analysiert werden.
   a) ***Eine neue Charge erzeugen*** aus dem Menü „Datei“ auswählen.
      - Beispiel: Wenn Sie für HLA-DRB1 analysieren, fügen Sie eine Charge für **HLA-DRB** hinzu.
      - Die Chargenmatrize ist bereitgestellt und erhält in diesem Fall die Bezeichnung HLA-DRB.
      - Bitte beachten Sie, dass die Matrizenversionen Chargenbezeichungs-spezifisch sind und den Chargenbezeichnungen der Sets entsprechen.
      - Folgen sie den schrittweisen Instruktionen, die für das Erzeugen von Chargen auf dem Bildschirm erscheinen.
      - **Bei der Bezeichnung der Charge sollte die Bezeichnung keine Kommas enthalten, da die nach einem Komma stehenden Informationen nach dem Datenexport verloren gehen.**
      - Weitere Instruktionen über die Erzeugung von Chargen und Multichargen finden Sie im Luminex IS Benutzerhandbuch
   b) Durch Anklicken des Ausschubsymbols wird der Plattenhalter ausgeschoben. Setzen Sie die 96-Kavitäten-Thermalcyclerplatte mit den Proben in den auf dem Plattenhalter befindlichen XYP-Hitzeblock.
   c) Klicken Sie auf das Einzugssymbol. Die Proben sind nun bereit für die Analyse. Ein Primerschritt sollte vor Starten des Durchgangs durchgeführt werden.
   d) Nachdem die Proben das Gerät durchlaufen haben sollte ein Sanitationsschritt mit 70 % Isopropanol bzw. 20 % Haushaltsbleichmittel gefolgt von zwei Waschschritten durchgeführt werden. Das Gerät kann an diesem Punkt abgeschaltet werden, falls es im Laufe des Tages nicht ein weiteres Mal gebraucht wird.
3. Nachdem eine Charge fertig gestellt ist, werden die Daten als kommagetrennte (csv) Datei exportiert. Diese Dateien haben die Bezeichnung „OUTPUT.CSV“ und werden in einem Verzeichnis mit der Chargenbezeichnung gespeichert, die in die Luminex IS eingetragen wird. Diese Daten sind anschließend verfügbar, um Typisierungszuweisungen, wie unten beschrieben, vorzunehmen.

*****Im Luminex IS Benutzerhandbuch finden Sie Informationen über die Bedienung der Geräte, einschließlich der Vorgehensweise beim täglichen Hochfahren, der Kalibrierung, der Wartung sowie dem Abschalten.

ERGEBNISSE

Die Probentypisierung kann folgendermaßen durchgeführt werden:
Die erzeugten CSV-Dateien können geöffnet und die Daten mit gebräuchlichen Tabellenkalkulationsprogrammen wie Microsoft Excel, Lotus 123, Corel Quattro Pro oder ähnlicher Software verarbeitet werden. Die Analyse umfasst die folgenden Schritte:

1) Verifizieren, dass die Anzahl der Ereignisse für jede SSO in jeder Probe bei mindestens 60 liegt. Diese Information ist im Abschnitt ***DataType: Count*** der CSV-Datei aufgeführt.
2) Feststellen, dass die Werte für die konsensuellen Sonden für jede Probe über dem Minimum ihrer mittleren Fluoreszenzintensität bzw. MFI liegen. Die Mindestnachweisgrenzwerte sind chargenspezifisch und sind in der Grenzwerttabelle aufgeführt.

Vorsicht:

- *Um verlässliche Ergebnisse zu erhalten, muss eine ausreichende Datenmenge durch das Luminex Instrumentarium gesammelt werden.*
- *Sammeln Sie für jede SSO mindestens 60 Ereignisse.*

3) Der *Hintergrundkontroll*wert für jede Sonde wird von den Probenwerten subtrahiert, wodurch sich der für den Hintergrund korrigierte Datensatz ergibt. Die Hintergrundkontrollwerte sind in der Grenzwerttabelle aufgeführt und sind chargenspezifisch. Hintergrundwerte sind durchschnittliche MFI-Werte für jedes Bead zur Kompensation von durch Beadvariation erzeugte Hintergrundgeräusche.
4) Für jede Probe werden die Hintergrund-korrigierten Daten für jede Sonde durch den Hintergrund-korrigierten Wert für die entsprechende konsensuelle Sonde dividiert. Sie ergeben so den normalisierten Datensatz.

$$\frac{\text{MFI (Sonde)} - \text{MFI (Kontrollleerstelle für Sonde)}}{\text{MFI (Konsensus)} - \text{MFI (Kontrollleerstelle für Konsensus)}}$$

5) Für jede Sonde wird der normalisierte Wert in die Grenzwerttabelle eingetragen.
6) Sobald sämtliche Werte zugeordnet worden sind, kann das Sondentreffer-Muster (d.h. die Kombination sämtlicher positiven und negativen Zuordnungen für eine bestimmte Probe) mit der (den) beigefügten Sondentreffer-Tabelle(n) verglichen werden.

Vorsicht:

- *Für jeden Locus und für jede Sondenmischung existiert eine eigene Grenzwerttabelle.*
- ***Diese Grenzwerttabellen sind chargenspezifisch. Überprüfen Sie, ob die Chargennummer auf den Grenzwerttabellen mit der Chargennummer des Typisierungssets übereinstimmt.***
- *Falls ein normalisierter Wert für eine bestimmte Sonde über dem maximalen Grenzwert für eine negative Zuordnung und unter dem Mindestwert für eine positive Zuordnung liegt, sollte die Probe als für diese Sonde nicht determiniert angesehen werden. Die Probe sollte zunächst in der Annahme eines negativen Werts und anschließend in der Annahme eines positiven Werts typisiert werden.*
- *Siehe weitere Informationen zu Grenzwerten im Abschnitt **ERWARTETE WERTE**.*

QUALITÄTSKONTROLLE

Es wird empfohlen, bei jedem Test gleichzeitig eine negative und eine positive Kontrolle durchzuführen, zum Beispiel jeweils eine Leerwertkontrolle mit Wasser oder eine vorher bereits typisierte Probe. In der Schwellenwerttabelle enthaltene Konsens-SSO-Proben hybridisieren zu ihren jeweiligen lokusspezifischen Allelen. Aus positiven Kontrollen mit den Konsens-SSOs erhaltene Werte sollten über dem im Arbeitsblatt für die Schwellenwerttabelle festgelegten Schwellenwert für SSO liegen. Aus Wasser mit den Konsens-SSOs erhaltene Werte sollten unter dem im Arbeitsblatt für die Schwellenwerttabelle festgelegten Schwellenwert für SSO liegen.

Die LIFECODES Sondenmischung(en) enthält/enthalten eine oder mehrere der in den Arbeitsblättern für das Typisierungsset identifizierten Konsens-SSO-Proben. Diese Konsens-Proben hybridisieren zu Allelen und dienen als interne Kontrollen zur Verifizierung der Amplifikation und zur Bestätigung, dass Hybridisierungen stattgefunden haben. Wird der Minimalwert für diese SSOs nicht erreicht, erfolgt möglicherweise keine korrekte Typisierung, so dass der Test wiederholt werden sollte.

Die Assays müssen entsprechend den Empfehlungen in der Packungsbeilage und unter Einhaltung aller vorgeschriebenen Qualitätskontrollverfahren entsprechend den Vorschriften der jeweiligen Zulassungsbehörden durchgeführt werden.

GRENZEN DES VERFAHRENS

Die beschriebenen PCR-Bedingungen und Assay-Bedingungen erfordern sorgfältige Kontrolle. Abweichungen von diesen Parametern können zum Versagen des Produkts führen.

Sämtliche Geräte müssen gemäß den Empfehlungen des Herstellers kalibriert sein und im Rahmen der vom Hersteller beschriebenen Parameter betrieben werden.

1) Die Beads müssen vor Gebrauch vorgewärmt und gut suspendiert werden. Dies gewährleistet, dass die Hybridisierungspuffer-Komponenten vollständig gelöst sind.
2) 47 ºC und 56 ºC Inkubationen erfordern ein hohes Maß an Genauigkeit (+/- 0,5 ºC). Ein Thermalcycler sollte zum Einsatz kommen. Die Temperatur in den Kavitäten der 96-Kavitäten-Thermalcyclerplatte unter Einsatz eines Thermoelements (z.B. Bio-Rad, Modell VPT-0300 bzw. ein entsprechendes anderes Modell) sollte überprüft werden. Die Temperatur in den Kavitäten sowie um die Kavitäten herum sollte um nicht mehr als +/- 0,5 ºC schwanken.
3) Bei 56 ºC ist die Zeit entscheidend und sollte nicht über insgesamt 15 Minuten liegen. Das schließt die 10-minütige Inkubation plus im Höchstfall 5 Minuten ein, um sämtliche Proben mit Verdünnungslösung/PE-Streptavidinmischung zu verdünnen.
4) Nach der Verdünnung sind die Proben bei Zimmertemperatur für bis zu 2 Stunden stabil (vor Licht schützen). Da eine volle 96-Kavitätenplatte bis zu 1,5 Stunden benötigen kann, um das Luminex Instrumentarium zu durchlaufen, sollte die Analyse spätestens 30 Minuten nach erfolgter Verdünnung gestartet werden, um zu gewährleisten, dass die letzte Probe innerhalb der zweistündigen Begrenzung analysiert wird.
5) Komponenten von verschiedenen Sets und Chargen nicht miteinander vermischen.

Wegen der Komplexität der HLA-Typisierung sollte nur geschultes Personal mit der Überprüfung der Dateninterpretation und den Typisierungszuordnungen betraut werden.

FEHLERBESEITIGUNG

PROBLEM	MÖGLICHE URSACHE		LÖSUNG
Niedrige Beadzahl	Sondenmischung nicht ausreichend suspendiert		Sondenmischung vorwärmen, beschallen und vortexen und Assay wiederholen.
	Gerät funktioniert nicht einwandfrei	Nicht kalibriert	Gerät kalibrieren. *(Siehe Luminex IS Benutzerhandbuch.)*
		Proben-Flusspfad blockiert	Nadel entfernen und beschallen. Rückspülung ausführen. Falls sich das Problem nicht beseitigen lässt, bei Immucor Transplant Diagnostics, Inc. anrufen. +32/ 3.385.47.91
CON Grenzwertfehler	Probe wurde nicht oder nur unzureichend amplifiziert*	Niedrige DNA	DNA-Konzentration und Reinheit überprüfen.
		Salze in Mastermix sind nicht ausreichend gelöst	Mastermix 5 Minuten bei 37 ºC halten, vorsichtig vortexen und kurz drehen.
		Unzureichende Taq-Polymerase	Nur rekombinante Taq verwenden. Versuchen Sie es mit Lifecodes Nr. 167075.
	Amplifizierungsbedingungen nicht innerhalb der spezifischen Parameter		Thermalprofil auf Thermalcycler laufen lassen, um zu überprüfen, ob die Parameter sich innerhalb der spezifischen Werte befinden.
	Niedriger Wert für die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI)		Verdünnungslösung vor Gebrauch 5 Minuten bei 45 ºC warm halten und vortexen. Bei Zimmertemperatur aufbewahren.
			Streptavidin-PE ersetzen.
Mehrfaches SSO-Versagen – oder Probe bringt kein HLA-Typisierungs-ergebnis	Allel-spezifische Amplifikation	Amplifizierungsbedingungen befinden sich nicht innerhalb der spezifischen Parameter	Thermalprofil auf Thermalcycler laufen lassen, um zu überprüfen, ob die Parameter sich innerhalb der spezifischen Werte befinden.
	DNA-Probe verunreinigt		DNA wieder von der Blutprobe isolieren.
	DNA teilweise zerfallen		
	Evaporation während des Hybridisierungsschrittes		Falls Sie nicht die vollständige Platte nutzen, lassen Sie auf jeder Seite der auszuwertenden Proben eine Reihe frei, damit die Platte fest versiegelt werden kann.

*** PCR-Amplifikation kann mittels Gel-Elektrophorese verifiziert werden (siehe Anhang A).**

ERWARTETE WERTE

Werte können in der Regel in positive und negative Werte aufgeteilt werden. In einigen wenigen Fällen ist ein Wert auch „nicht determiniert". Ein „nicht determinierter Wert" befindet sich in einem Bereich, in dem weder positive noch negative Werte beobachtet wurden. Falls eine Probe nicht determinierte Werte

für eine bestimmte SSO-Sonde enthält, sollte die Probe zunächst mit der negativ bewerteten Sonde und anschließend mit der positiv bewerteten Sonde typisiert werden. Drei Fälle können auftreten:

1. Ein (1) Durchlauf (d.h. der positive bzw. der negative) liefert eine Übereinstimmung.
2. Beide Durchläufe liefern Übereinstimmungen.
   - Die Probe kann erneut getestet werden, bzw. die bei beiden Typisierungen erhaltenen Allele können aufgenommen werden.
3. Keiner der Durchläufe liefert eine Übereinstimmung.
   - In diesem Fall ist es wahrscheinlich, dass auch andere Sonden unzutreffend zugeordnet worden sind. Diese Probe muss erneut getestet und eventuell erneut amplifiziert werden.

- Falls mehr als zwei Sonden nicht-determiniert sind, sollte die Probe erneut getestet werden.
- Falls ein Sondentreffermuster keinen HLA-Typ hervorbringt, sollte die Probe erneut amplifiziert und erneut getestet werden. Es kann sich auch als notwendig erweisen, die DNA nochmals von der Probe zu isolieren sowie erneut zu amplifizieren und zu testen.
- Wie im Abschnitt ***Grenzen des Verfahrens*** beschrieben, ist es entscheidend, dass das Protokoll genau eingehalten wird. Jede Abweichung kann Versagen bei der Probentypisierung zur Folge haben.

BESONDERE LEISTUNGSMERKMALE

Bei Verwendung der LIFECODES HLA SSO-Typisierungssets in Übereinstimmung mit dem in der Produktbeilage beschriebenen Verfahren kann der HAL-Typ Klasse I und Klasse II der DNA-Proben bestimmt werden. Bitte rufen Sie Immucor Transplant Diagnostics, Inc. unter 1- 888-329-0255 an, um ausführliche Informationen zu den spezifischen Leistungsmerkmalen zu erhalten.

LITERATUR

1. Olerup, O., et al. (1992) Tissue Antigens 39:225
2. Saiki, RK., et al. (1986) Nature 324: 163
3. Maeda, M., et al. (1989) Tissue Antigens 34: 290
4. Bugawan, TL., et al. (1990) Immunogenetics 32: 231

EINGESCHRÄNKTE LIZENZ

Dieses Produkt wird nicht mit Taq Polymerase ausgeliefert und beinhaltet keine Lizenz für die ausländischen Patente von F. Hoffmann-La Roche AG und Roche Molecular Systems, Inc. zur Durchführung des in diesen Patenten beschriebenen Prozesses für die Polymerase-Kettenreaktion („Polymerase-Chain-Reaction, PCR“). Weitere Informationen zur Notwendigkeit des Erwerbs von Kauflizenzen in Ihrem Land können über die F. Hoffmann-La Roche AG bzw. über Roche Molecular Systems, Inc. eingeholt werden. Der Erwerb dieses Produkts schließt eine eingeschränkte, nicht übertragbare Lizenz unter dem U.S.-Patent 5,981,180 bzw. dessen ausländischen, im Eigentum der Luminex Corporation befindlichen Entsprechungen zur Durchführung von Mehrfachanalysen klinischen Probenmaterials für die HLA-Typisierung ein.

Hersteller: Immucor Transplant Diagnostics, Inc., 550 West Avenue, Stamford, Connecticut 06902; USA
Tel.: +1 203 328 9500 oder (888)-329-0255 (gebührenfrei in den USA und Kanada); Fax: +1 203 328 9599

Bevollmächtigter Vertreter: Emergo Europe, Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague, The Netherlands.
Tel.: (31) (0) 70 345 8570 Fax: (31) (0) 70 346 7299

Technischer Dienst innerhalb Europas: Tel.: +32/3 385 4791

Dieses Dokument wurde zuletzt geändert und ausgegeben am: Rev 19, 2014-01-07

VERWENDETE WARENZEICHEN

AB Gene®	AB Gene House	IDNA® Agarose	Cambrex Bio Science
Costar®	Corning Incorporated	QIAAmp™	Qiagen Inc.
Microseal™	Bio-Rad Laboratories, Inc.	GelStar®	Cambrex Bio Science
Luminex®	Luminex Corporation		

ANHANG A

Gel-Elektrophorese

Die mit den LIFECODES HLA-SSO-Typisierungssets durchgeführten PCR-Reaktionen sind so beschaffen, dass sie sowohl doppel- als auch einsträngige Produkte erzeugen, die die vorherrschenden Produkte darstellen, die zu SSOs hybridisieren. Zur Qualitätssicherung bzw. zur Fehlerbeseitigung bei einem Experiment, kann es unter Umständen erforderlich sein, Gel-Elektrophorese durchzuführen, um die PCR-Reaktion nach dem Vorliegen von amplifizierter DNA zu überprüfen.

Benötigtes Material (nach Liste bzw. entsprechend)

- Elektrophorese-Agarose (Cambrex IDNA® Agarose Nr. 50170)
- Elektrophorese-Gerät/Stromversorgung
- 1X Gelpuffer (40xTAE, Promega Nr. V4281)
- GelStar® Nukleinsäure-Gelfarbstoff (Cambrex Nr. 50535)
- UV-Transilluminator (ChromatoVUE, UVP Inc. Modell TM36)
- Fotografisches Abbildungssystem

Die relative Migration des einsträngigen Produkts hängt von der Gel-Konzentration sowie dem eingesetzten Puffersystem ab. Ungefähre Migrationswerte für jede Amplifikation sind weiter unten für Proben aufgeführt, die in 2%igem Agarose-Gel in 1X TAE-Puffer getestet wurden.

Elektrophoresebedingungen

1. GelStar® Nukleinsäure-Farbmarker (Cambrex Nr. 50535) zum Auftauen aus dem Gefrierfach nehmen. Im Dunkeln aufbewahren.
2. Das für diesen Vorgang verwendete Gel muss bei 2 % liegen, d.h. für ein 200-ml-Gelbett sind 4 Gramm Agarose zu 200 ml 1X TAE zu verwenden (Verdünnen aus 40X TAE). 10 µl GelStar® Nukleinsäure-Farbmarker der geschmolzenen Agarose beifügen. Beim Ausgießen des Gels darauf achten, dass reichlich Platz bleibt, damit der DNA eine ausreichende Distanz (2,5 bis 5 cm) zur Verfügung steht. **VORSICHT BEI DER VERWENDUNG: GelStar® ist potentiell karzinogen.**

ANMERKUNG: Es ist möglich, Gels mit 20 µl von 10 mg/ml Ethidiumbromid an Stelle von GelStar® Nukleinsäure-Farbmarker zu verwenden. Bandenintensität der Produktbanden ist in Gels auf Ethidiumbromid-Basis geringer als in Gels mit GelStar®. **VORSICHT BEI DER VERWENDUNG: Ethidiumbromid ist als krebserregend bekannt.**

3. Gel im Dunkeln aufbewahren und fest werden lassen.

4. Eine Mischung von 2,5 µl jedes PCR-Produkts und 2,5 µl 2X Ladepuffer mit sichtbarem Farbstoff pro Probe pro Amplifikation. Gel im Dunkeln bei etwa 160 Volt 45 Minuten laufen lassen bzw. bis die Probe weit genug läuft, dass verschiedene Banden für ein- und doppelsträngige Produkte sichtbar werden (Bromphenolblau-Bande oder andere Farbmarker wandern 2,5 bis 5 cm von den Kavitäten).
5. Unter Verwendung eines UV-Transilluminators mit einem gelben fotografischen GelStar® Filter (Cambrex Nr 50536) fotografieren.

VORSICHT: Beim Hantieren mit GelStar® Nukleinsäure-Farbmarker bzw. Ethidiumbromid sowie beim Fotografieren von Gel mit dem UV-Transilluminator Schutzausrüstung tragen.

6. Gelanalyse

	HLA-C	HLA-DPB	HLA-DQA
Doppelsträngig (bp)	~476, ~447	~280	~280, ~240
Einsträngig (bp)	~250, ~200	~180	~180, ~160

Gel-Interpretation